

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 21, 1983, pp. 97–106

Vergleich und Gegenüberstellung zweier kinetischer UV-Tests und dreier Endpunktmethoden mit Visualisierung der NAD-abhängigen Reaktion mittels Tetrazoliumsalzen zur Bestimmung von Triglyceriden im Serum

Von A. Bruckner und M. Moreth

Zentrallaboratorium (Chefarzt Dr. med. W. Fritzsche) des Städtischen Krankenhauses Frankfurt a.M.-Höchst

(Eingegangen am 11. Januar/9. September 1982)

Gewidmet Herrn Chefarzt Dr. med. Walter Fritzsche zum 60. Geburtstag

Zusammenfassung: Neben die inzwischen als klassisch zu bezeichnenden Verfahren zur Triglyceridbestimmung mit alkalischer Verseifung oder vollenzymatischer Spaltung zu freien Fettsäuren und nachfolgender Endpunktbestimmung des Glycerins über eine NADH/NAD-Messung im UV-Spektralbereich als Endpunktmethode sind in letzter Zeit abgewandelte Triglyceridbestimmungsmethoden getreten. Zum einen gestatten schnelle, kinetisch messende Analysenautomaten die NADH/NAD-Messung im UV-Spektralbereich nach dem kinetischen Meßprinzip. Zum anderen kann eine höhere Meßgenauigkeit und Auflösbarkeit des NADH/NAD-Schritts durch eine Visualisierungsreaktion im sichtbaren Spektralbereich über eine nachfolgende Reaktion vom Typ Tetrazoliumsalz/Formazanderivat erreicht werden. In dieser Arbeit werden zwei vollenzymatische kinetische UV-Triglyceridbestimmungsmethoden und drei vollenzymatische Methoden mit nachfolgender Visualisierung des NADH/NAD-Schritts hinsichtlich Präzision, Richtigkeit, Wiederfindung, Linearität, Vergleichbarkeit der Meßergebnisse untereinander sowie Störanfälligkeit gegenüber endogenen und exogenen Substanzen verglichen. Die Ergebnisse sind tabellarisch gegenübergestellt.

Evaluation and comparison of two kinetic UV tests and three endpoint tests with visualization of the NAD dependent reaction by tetrazolium salts for the determination of triglycerides in serum

Summary: The classical procedure to determine triglycerides is the alkaline or fully enzymatic hydrolysis into fatty acids and glycerol with subsequent measurement of the NADH/NAD dependent reaction by UV spectrometry as an endpoint procedure.

The necessity of greater rapidity and the use of kinetic measuring automatic clinical analysers make the introduction of the kinetic measuring principle for the NADH/NAD estimation in the UV procedures possible.

Another method to determine NADH/NAD exists in visible indication by use of a subsequent reaction of the type tetrazolium salt/formazane. In this paper we compare two fully enzymatic UV tests with three methods using subsequent visualization of the NADH/NAD dependent reaction with regard to precision, accuracy, linearity correlation of the measured results and interferences by endogenous and exogenous substances. The results are presented as tables.

Einführung

Die parallele Bestimmung von Triglyceriden und Cholesterin gehört zum Basisprogramm der Hyperlipidämiediagnostik jedes klinisch-chemischen Laboratoriums.

Wegen der unbestrittenen Wichtigkeit der Triglyceridbestimmung zur Hyperlipidämiediagnostik (1–7) hat die in letzter Zeit von verschiedenen Herstellern auf dem Markt angebotene Zahl von Triglyceridbestimmungsmethoden zugenommen. Vielfach be-

währt haben sich die Methoden mit alkalischer Verseifung oder enzymatischer Spaltung zu Glycerin und freien Fettsäuren. Das freigesetzte Glycerin wird über eine vollenzymatische Nachreaktion, in deren Verlauf NADH entsteht, welches im UV-Spektralbereich gemessen werden kann, durch Endpunktbestimmung ermittelt.

Der Einsatz schneller Analysenautomaten im klinisch-chemischen Labor hat zur Einführung der kinetischen NADH/NAD UV-Bestimmung mittels kompetitiver Hemmung durch ATP geführt (8, 9). Ein anderer Weg zur Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit und Steigerung der Meßempfindlichkeit führt zur Visualisierung der NAD(P)-abhängigen Reaktion im sichtbaren Spektralbereich (10). Demzufolge werden seit neuestem von mehreren Herstellerfirmen vollenzymatische Endpunktreaktionen zur Bestimmung von Triglyceriden im Serum mit Diaphorase/INT¹⁾ oder MTT¹⁾ als nachfolgende NAD-gekoppelte Nachweisreaktion angeboten.

In unserer Arbeit vergleichen wir zwei kinetische UV-Triglyceridmethoden und drei neue Endpunktmethoden mit nachfolgender Visualisierungsreaktion hinsichtlich Präzision, Richtigkeit, Wiederfindung, Linearität, Vergleichbarkeit der Meßergebnisse untereinander sowie Störanfälligkeit gegenüber endogenen und exogenen Substanzen.

¹⁾ INT = Iod-Nitro-Tetrazoliumchlorid.

MTT = Methyl-Thiazolyl-Tetrazoliumbromid, Thiazolyl Blue.

Methodenbeschreibung

Geräte

Alle Messungen wurden auf einem Analysenautomaten ACP 5040 Eppendorf durchgeführt, um Einflüsse, die durch die Bestimmung auf verschiedenen Meßgeräten eintreten könnten, auszuschließen. Das Gerät gestattet in der von uns verwendeten Spezifikation sowohl kinetische als auch Endpunktmessungen. Die gerätespezifische Charakteristik und die Einsatzmöglichkeiten dieses Analysengerätes sind bereits weitgehend in der Literatur beschrieben (11). Die Geräteeinstellung am ACP 5040 zeigt die Tabelle 1.

Für statistische Berechnungen verwendeten wir Commodore CBM, Rechner 8032, Floppy Disk 8050 und Drucker 8024 (Commodore GmbH., Postfach 426, 6078 Neu Isenburg).

Tests und Testprinzipien

Bei den von uns untersuchten Tests zur Triglyceridbestimmung handelt es sich um folgende *kinetische UV-Tests*:

1. Triglyceride vollenzymatischer UV-Test Boehringer Mannheim (BM UV-Test, vollenzymatisch)
2. Triglycerid Rapid Test „Roche“ von Hoffmann La Roche (Rapid Test (Roche)).

Bei den *Endpunktmethoden mit nachgeschalteter Diaphorase/Tetrazoliumsalz-Indikation* handelt es sich um folgende Tests:

3. Merz und Dade Triglycerid-Test von AHS/Deutschland (MD)
4. Testomar-Triglyceride vollenzymatisch/INT von Behringwerke AG (Testomar, vollenzymatisch/INT, Behring).
5. Peridochrom-Triglyceride von Boehringer Mannheim (BM Peridochrom).

Die von uns untersuchten Triglyceridmethoden zählen zu den sogenannten vollenzymatischen Tests, bei denen der erste Reaktionsschritt, die alkalische Hydrolyse nach *Kreutz & Eggstein*, durch eine enzymatische Hydrolyse ersetzt wird (12, 13). Bereits bei der enzymatischen Hydrolyse bestehen jedoch Unterschiede zwischen den untersuchten Tests.

Tab. 1. Geräteeinstellung am ACP 5040.

Methoden	BM UV-Test, vollenzymatisch	BM Peridochrom	MD	Rapid Test (Roche)	Testomar, vollenzymatisch/INT, Behring
Art der Bestimmung	Kinetik	Endpunkt	Endpunkt	Kinetik	Endpunkt
Name	Triglyceride	Triglyceride	Triglyceride	Triglyceride	Triglyceride
Einheit	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l
Temperatur (°C)	37	37	37	37	37
Takt, S	12	15	20	12	20
Wellenlänge (nm)	334	578	546	334	546
Abgleich E	0,6	0,0	0,0	0,6	0,0
Faktor/Standard	2,28	2,28	2,28	2,28	1,208
Rotordrehung	1	1	1	1	1
Spülposition	18	18	18	18	18
Startposition	2	12*)	12*)	3	12*)
Vol. Pos. 1 (µl)**)	500	500	500	500	250
Vol. Pos. 2 (µl***)	5	5	5	5	5
Vol. Pos. 5 (µl****)	50	0	0	50	0

*) nur Mischer

**) Reagenz

***) Probe

****) Startreagenz

Tab. 2. Gegenüberstellung von Reaktionsprinzipien und Adaptationscharakteristika am ACP 5040 (37 °C Reaktionstemperatur) für die fünf von uns untersuchten Triglyceridbestimmungsmethoden.

BM UV-Test, vollenzymatisch BM Peridochrom		MD	Rapid Test (Roche)		Testomar, vollenzymatisch/INT, Behring
Hydrolyse	Triglyceride	$\xrightarrow[\text{Esterase}]{\text{Lipase+}}$ Glycerin	Triglyceride	$\xrightarrow[\text{Proteinase}]{\text{Lipase+}}$ Glycerin	Triglyceride $\xrightarrow{\text{Lipase}}$ Glycerin
Reaktion	nach Eggstein/Kreutz	Glycerin $\xrightarrow[\text{dehydrogenase}]{\text{Glycerin-}}$ Dihydroxyacetone	Glycerin	Glycerin $\xrightarrow{\text{Glycerinkinase}}$ Glycerin-3-phosphat	Glycerin $\xrightarrow{\text{Glycerinkinase}}$ Glycerin-3-phosphat
		NADH+MTT $\xrightarrow{\text{Diaphorase}}$ Formazan		nach Eggstein/Kreutz	Glycerin-3- Glycerin-3-phosphat- Dihydroxy-phosphat $\xrightarrow{\text{dehydrogenase}}$ acetonphosphat
Bestim- mungsart	kinetisch	Endpunkt	kinetisch	Endpunkt	NADH+INT $\xrightarrow{\text{Diaphorase}}$ Formazan
Wellen- länge (nm)	334	578	334	546	546
Inkuba- tionszeit (min)	3	3,75	3	5	5
Standard	Precimat	Precimat	aus der Packung	Precimat	Lipid-Standard-Serum (lyophilisiert)
Start- reagenz	ja	nein	nein	ja	nein
Proben- Reagenz Verhältnis	1:111	1:101	1:101	1:111	1:51
Halbbar- keit des Reaktions- gemisches (h) im Kühl- schrank	7	24	24	72	120
Bestell-Nr.	244473	575437	241204	0710709	OSRW 10/11

Bei der kinetischen Methode „Rapid Test (Roche)“ wird für die Hydrolyse nach *Bucolo & David* (12) Lipase und Protease (α -Chymotrypsin) eingesetzt. Des weiteren verläuft diese Reaktion, wie auch die kinetische Boehringer UV-Version, nach *Eggstein & Kreutz*, wobei für die letztere Methode eine Hydrolyse der Triglyceride mit Lipasen und Esterasen nach *Wahlefeld* (13) Verwendung findet.

Bei den Endpunktmethode MD und BM Peridochrom wird zur Hydrolyse ebenfalls Lipase und Esterase eingesetzt; bei der Endpunktmethode Testomar, vollenzymatisch/INT, Behring nur Lipase. Bei den drei Endpunktmethode unterscheidet sich nicht nur die Art der Umsetzung des gebildeten Glycerins zu NADH, zusätzlich bestehen auch Unterschiede in den zur Visualisierung verwandten Reaktionswegen.

Bei den Methoden MD und Testomar, vollenzymatisch/INT Behring wird mittels Glycerokinase Glycerin-3-phosphat gebildet, welches durch die Glycerin-3-phosphat-dehydrogenase zu Dihydroxyacetonphosphat oxidiert wird. Das dabei aus NAD entstehende NADH reduziert mittels Diaphorase das Tetrazoliumsalz INT = (2-(*p*-Iodophenyl)-3-(*p*-nitrophenyl)-5-phenyl-tetrazoliumchlorid) in das sehr intensiv gelb gefärbte Formazanderivat.

Im Gegensatz dazu wird bei BM Peridochrom Glycerindehydrogenase für die Umsetzung des Glycerins eingesetzt. Das bei dieser Reaktion entstehende NADH reduziert seinerseits ein anderes Tetrazoliumsalz, MTT = 3-(4'-5'-dimethyl-thiazolyl-2-)-2,4-diphenyltetrazoliumbromid) mittels Diaphorase zum entsprechenden Formazanderivat.

Einen Überblick über die von uns untersuchten Methoden hinsichtlich Methodik, Zusammensetzung und Konzentration der Reaktionspartner zeigen die Tabellen 2 und 3.

Reagenzien

Lipid-Standard für Testomar-Triglyceride, vollenzymatisch/INT Best.-Nr.: OSUT 16/17, Chargen-Nr.: 619501; Kontrolllogen-L Chargen-Nr.: 623116 E; Kontrolllogen-LP Chargen-Nr.: 623205 A von Behringwerke.

Precimat Glycerin 21,0-mg/dl Best.-Nr.: 166588; Precilip Chargen-Nr.: 09370 von Boehringer Mannheim.

Glyceridpuffer Best.-Nr.: 241205; Moni-Trol II E Chargen-Nr.: PTD-64; Bilirubin Control Chargen-Nr.: BIC-964 von AHS/Deutschland GmbH.

Validate-A Chargen-Nr.: 1996080 von Goedecke AG (D-1000 Berlin).

Biseko-Serum-Konserven, Reg.-Nr.: 45169 von Biotest-Serum-Institut GmbH (D-6000 Frankfurt).

Ergebnisse und Diskussion

Präzision

Präzision in der Serie

Die Präzision in der Serie zeigt die Tabelle 4. Sie wurde ermittelt mit denselben vier Kontrollseren an drei verschiedenen Tagen mit einer Serienlänge von $n = 7$ Proben.

Tab. 3. Chemische Zusammensetzung der in den verschiedenen Testpackungen enthaltenen Reagenzien.

Methoden	BM UV-Test, vollenzymatisch	BM Peridochrom	MD	Rapid Test (Roche)	Testomar, vollenzyma- tisch/INT Behring
Glycylglycinpuffer (mmol/l)	—	100	—	—	—
Phosphatpuffer (mmol/l)	50	—	100	k.A.*)	k.A.*)
pH	7,0	8,1	7,9	7,1	8,1
Magnesiumsulfat (mmol/l)	4	—	—	—	—
Detergent (g/l)	—	2	—	—	—
Ammoniumchlorid (mmol/l)	—	160	—	—	—
Na-Dodecylsulfat (mmol/l)	0,35	—	—	—	—
Rinderserumalbumin (g/l)	2	—	—	—	—
Magnesiumchlorid (mmol/l)	—	—	1,8	—	—
Stabilisatoren (?) (mmol/l)	—	—	0,68	—	+))
Mg ²⁺ (mmol/l)	—	—	—	—	1,5
ATP (mmol/l)	20	—	2,8	>0,18	2,5
Phosphoenolpyruvat (mmol/l)	18	—	—	>0,4	—
NADH (mmol/l)	12	—	—	>0,19	—
NAD (mmol/l)	—	≥1,7	4	—	5,5
Lipase (U/l)	≥5000000	≥90000	150000	—	ausreichend
Esterase (U/l)	≥30000	≥900	—	—	—
Lipase/ α -Chymotrypsin (U/l)	—	—	—	>10000	—
Pyruvatkinase (U/l)	≥50000	—	—	>200	—
Lactatdehydrogenase (U/l)	≥300000	—	—	>200	—
Glycerinkinase (U/l)	≥7000	—	580	>300	≥800
Glycerin-3-phosphat-dehydrogenase (U/l)	—	—	26000	—	≥24000
Iod-Nitro-Tetrazoliumchlorid (mmol/l)	—	—	0,68	—	0,49
Methyl-Thiazolyl-Tetrazoliumbromid (g/l)	—	≥0,27	—	—	—
Diaphorase (U/l)	—	≥400	6000	—	≥4500
Glycerindehydrogenase (U/l)	—	≥6000	—	—	—

*) keine Konzentrationsangabe

Angegeben ist sowohl der einzelne Variationskoeffizient jedes Kontrollserums als auch das geometrische Mittel aller vier Kontrollseren für jede Triglyceridmethode. Wie allgemein zu erwarten, liegt die

Präzision in der Serie niedriger als die von Tag zu Tag. Alle Methoden liegen in der gleichen Größenordnung mit geringerem, jedoch statistisch nicht zu sicherndem Variationskoeffizient der drei Endpunktmethoden.

Tab. 4. Präzision in der Serie¹⁾, $\bar{x} \pm s$ in mmol/l, VK in %.

Methoden	Kontrollseren ²⁾												
	Kontrollseren-L Sollwert = 1,254 ³⁾			Validate-A Sollwert = 0,649 ⁴⁾			Moni-Trol II E Sollwert = 1,086 ⁵⁾			Precilip Sollwert = 1,687 ⁶⁾			mitt- lerer geo- metr.
	\bar{x}	s	VK	\bar{x}	s	VK	\bar{x}	s	VK	\bar{x}	s	VK	
BM UV-Test, voll-enzymatisch	1,231	0,039	3,22	0,682	0,044	5,43	1,083	0,021	1,92	1,592	0,029	1,84	2,80
BM Peridochrom	1,322	0,035	2,68	0,602	0,012	1,91	1,087	0,028	2,62	1,551	0,041	2,63	2,44
MD	1,311	0,019	1,47	0,663	0,012	1,86	1,193	0,019	1,56	1,769	0,045	2,52	1,81
Rapid Test (Roche)	1,357	0,036	2,69	0,724	0,022	3,03	1,249	0,034	2,70	1,737	0,047	2,69	2,80
Testomar, voll-enzymatisch/ INT Behring	1,129	0,024	2,10	0,562	0,015	2,69	1,088	0,024	2,17	1,516	0,052	3,41	2,54

¹⁾ Ermittelt an drei aufeinanderfolgenden Tagen, mit je einer Serie von 7 Bestimmungen (n = 21). Die statistischen Angaben sind die aus drei Serien errechneten geometrischen Zahlen.

²⁾ Konzentrationen in mmol/l

³⁾ Vollenzymatisch, ohne Abzug des freien Glycerins, für die Methoden: Behring, Calbiochem, Roche.

⁴⁾ Vollenzymatisch, ohne Abzug des freien Glycerins, Glycerin/INT/Formazan, für die Methoden: Biomed, Human.

⁵⁾ Vollenzymatischer UV-Test, ohne Abzug des freien Glycerins, für die Methoden: Boehringer, Roche, Ingotest.

⁶⁾ Vollenzymatischer UV-Test, ohne Abzug des freien Glycerins.

Tab. 5. Präzision von Tag zu Tag¹⁾, $\bar{x} \pm s$ in mmol/l, VK in %.

Methoden	Kontrollseren ²⁾												
	Kontrollseren-L Sollwert = 1,254 ³⁾			Validate-A Sollwert = 0,649 ³⁾			Moni-Trol II E Sollwert = 1,086 ³⁾			Precilip Sollwert = 1,687 ³⁾			mitt- lerer geo- metr.
	\bar{x}	s	VK	\bar{x}	s	VK	\bar{x}	s	VK	\bar{x}	s	VK	
BM UV-Test, voll-enzymatisch	1,251	0,063	5,01	0,656	0,039	6,08	1,079	0,037	3,44	1,557	0,054	3,49	4,37
BM Peridochrom	1,275	0,040	3,16	0,629	0,040	6,42	1,131	0,055	4,88	1,569	0,050	3,20	4,22
MD	1,287	0,046	3,60	0,664	0,037	5,53	1,237	0,054	4,37	1,737	0,109	6,25	4,83
Rapid Test (Roche)	1,353	0,093	6,86	0,766	0,067	8,69	1,226	0,086	7,05	1,693	0,134	7,93	7,60
Testomar, voll-enzymatisch/ INT Behring	1,181	0,038	3,25	0,646	0,055	8,46	1,189	0,049	4,10	1,551	0,052	3,34	4,41

¹⁾ Ermittelt an 21 aufeinanderfolgenden Tagen (n = 21).

²⁾ Konzentrationen in mmol/l

³⁾ Sollwerte wie in Tabelle 4.

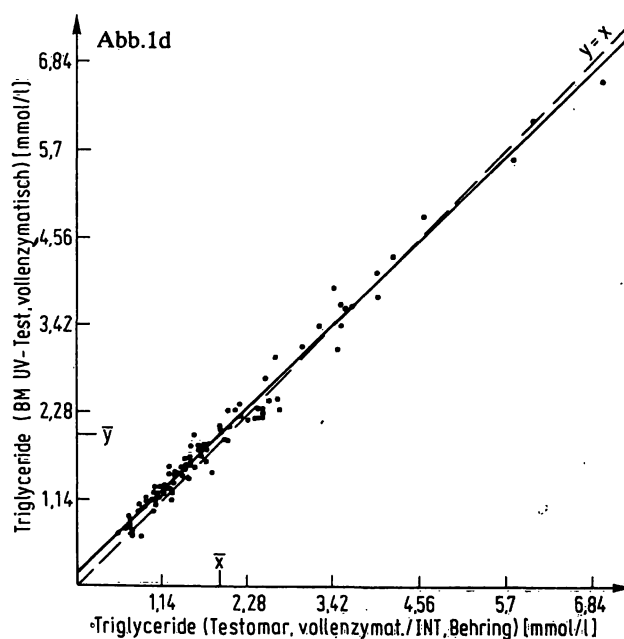
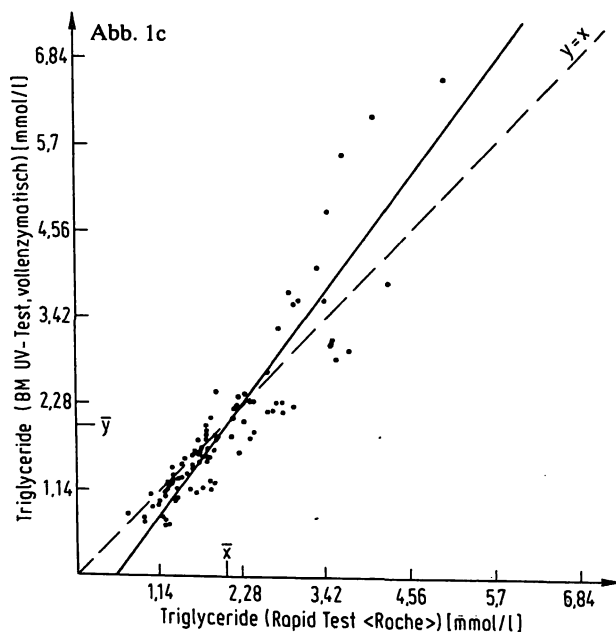
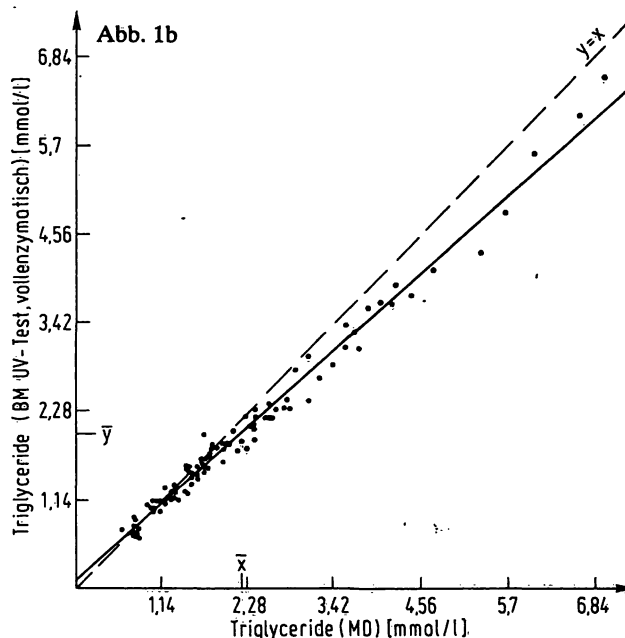
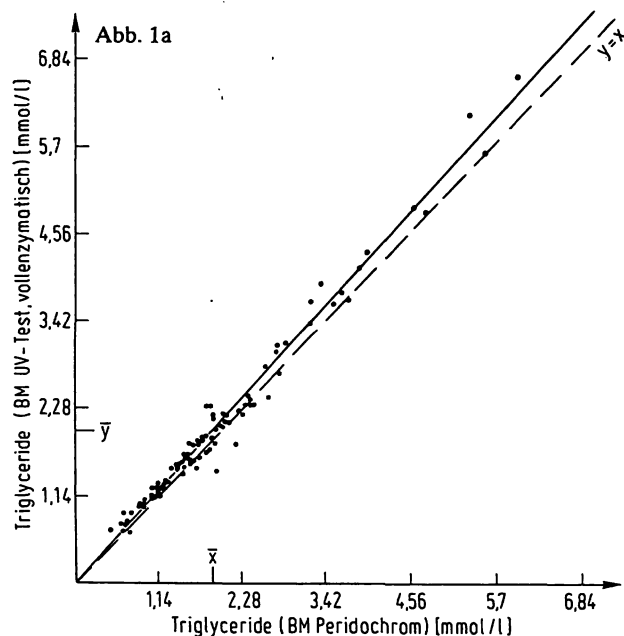
Präzision von Tag zu Tag

Die Präzision von Tag zu Tag gibt die Tabelle 5 wieder. Es wurden an 21 aufeinanderfolgenden Tagen der Variationskoeffizient von vier verschiedenen Kontrollseren bestimmt und für jede der fünf untersuchten Triglyceridmethoden sowohl der Variationskoeffizient für jedes einzelne Kontrollserum als auch das geometrische Mittel aus den Variationskoeffizienten aller vier Kontrollproben berechnet.

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich, liegen die gemittelten Variationskoeffizienten mit Ausnahme der Triglyceridmethode Rapid Test (Roche) in der gleichen Größenordnung von 4–5%.

Vergleich der Methoden untereinander

Um die vier Triglyceridbestimmungsmethoden untereinander zu vergleichen, wurden 99 unausgewählte Sera mit allen fünf Methoden bestimmt. Die Abbildung 1 und die Tabelle 6 geben die Regression jeder Methode, verglichen mit jeder anderen, wieder. Die Regressionskoeffizienten wurden nach der Methode der standardisierten Hauptkomponente ermittelt, d.h. als Regressionsgerade wird das geometrische Mittel aus einer Regression von y nach x und von x nach y berechnet und in die Abbildungen eingezeichnet (14, 15).



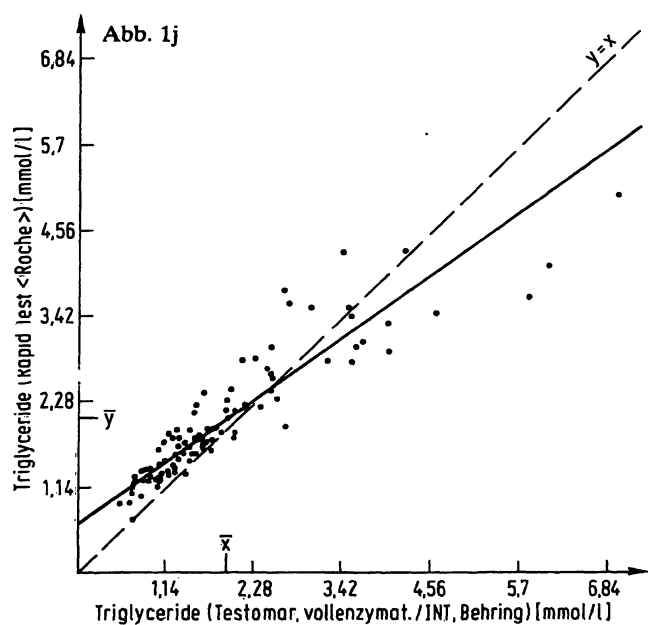
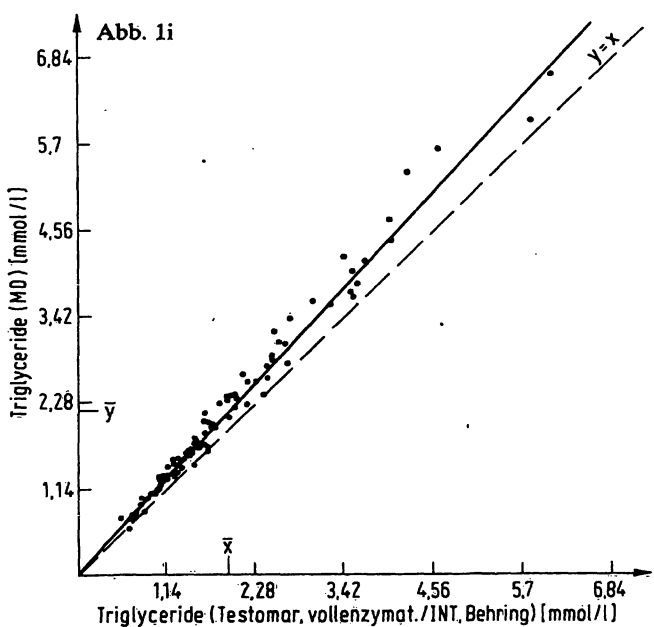
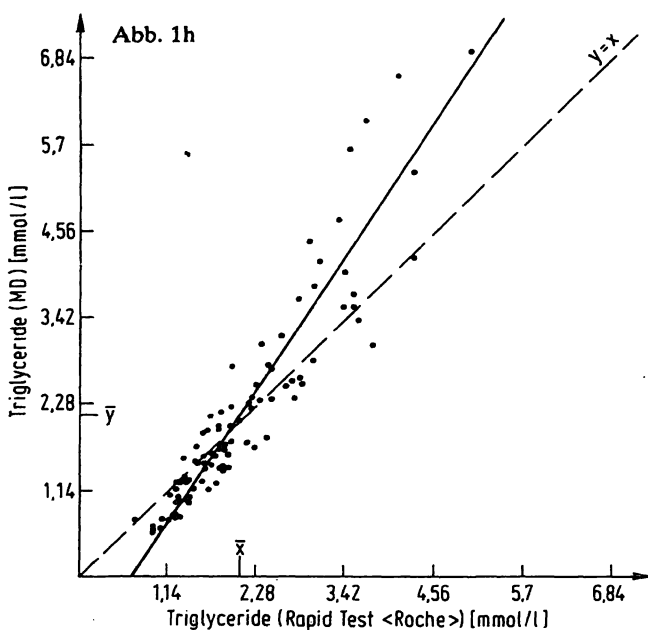
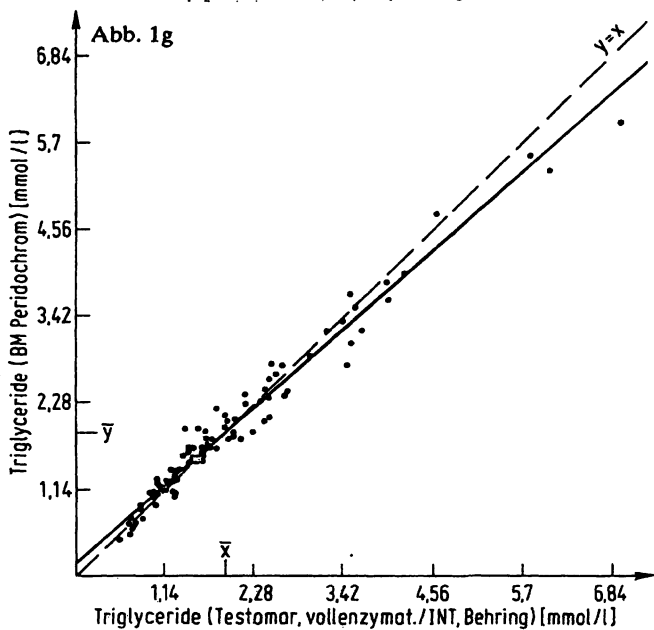
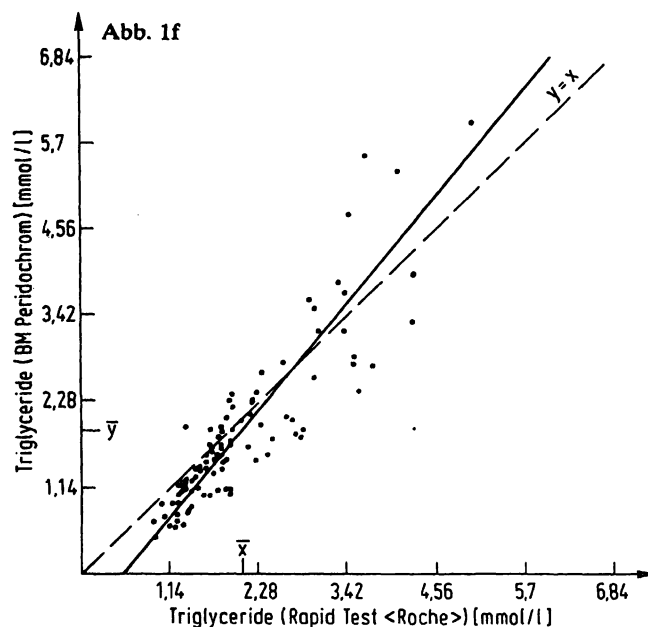
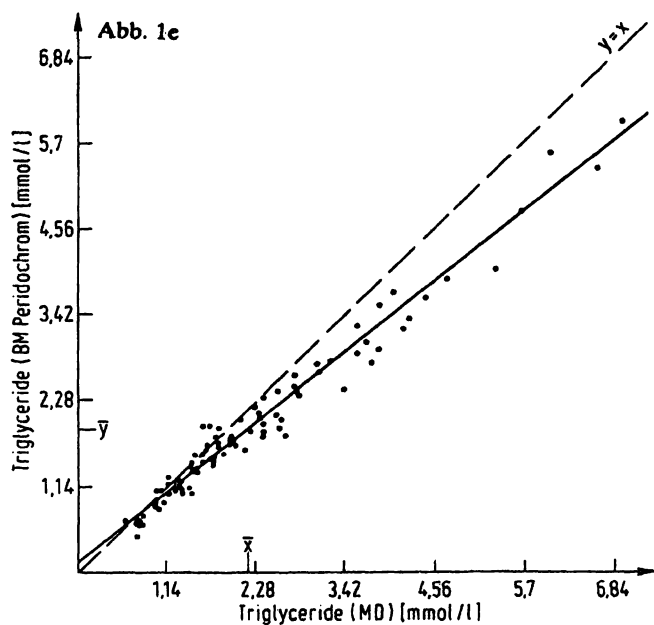


Abb. 1a–j. Korrelation der Meßergebnisse nach der standardisierten Hauptkomponentenmethode. Siehe dazu Tabelle 6.

Tab. 6. Methodenvergleich nach der Methode der standardisierten Hauptkomponente. Konzentrationen in mmol/l; N = 99.

Methoden	BM Peridochrom	MD	Rapid Test (Roche)	Testomar, vollenzymatisch/INT, Behring
	$\bar{X} = 1,89$ $S_x = 1,07$	$\bar{X} = 2,16$ $S_x = 1,31$	$\bar{X} = 2,06$ $S_x = 0,86$	$\bar{X} = 1,92$ $S_x = 1,18$
BM UV-Test, vollenzymatisch $\bar{y} = 1,99$ $S_y = 1,13$	$y = -0,024 + 1,06 x$ $r = 0,9891$ $S_d = 0,97$	$y = 0,118 + 0,87 x$ $r = 0,9910$ $S_d = 1,71$	$y = -0,722 + 1,32 x$ $r = 0,9206$ $S_d = 0,67$	$y = 0,149 + 0,96 x$ $r = 0,9900$ $S_d = 0,75$
BM Peridochrom $\bar{y} = 1,89$ $S_y = 1,07$		$y = 0,133 + 0,81 x$ $r = 0,9843$ $S_d = 2,67$	$y = 0,656 + 1,24 x$ $r = 0,8935$ $S_d = 1,64$	$y = 0,162 + 0,90 x$ $r = 0,9845$ $S_d = 0,21$
MD $\bar{y} = 2,16$ $S_y = 1,31$			$y = -0,969 + 1,52 x$ $r = 0,9264$ $S_d = 1,04$	$y = 0,035 + 1,11 x$ $r' = 0,9903$ $S_d = 2,46$
Rapid Test (Roche) $\bar{y} = 2,06$ $S_y = 0,86$				$y = 0,660 + 0,73 x$ $r = 0,9074$ $S_d = 1,42$

Sd = Streuung der Differenzen

Tab. 7. Rangvarianzanalyse abhängiger Stichproben nach Wilcoxon & Wilcoxon. Methodenvergleich untereinander.

Methoden		BM Peridochrom	BM UV-Test, vollenzymatisch	Rapid Test (Roche)	MD
	Rangsumme	217	247	379	397
Rangsummendifferenzen					
Testomar, vollenzymatisch/INT, Behring	195	22	52	184	202
BM Peridochrom	217		30	162	180
BM UV-Test, vollenzymatisch	247			132	150
Rapid Test (Roche)	379				18

Entscheidungsgrenzwerte (kritische Differenz) für $n = 99$ Bestimmungen und $k = 5$ Methoden bei Irrtumswahrscheinlichkeit $p = 0,05$ gleich 61 und bei Irrtumswahrscheinlichkeit $p = 0,01$ gleich 72. Werte oberhalb dieser Grenzwerte bedeuten Signifikanz.

Die Nullhypothese, alle Methoden liefern Werte, die einer gemeinsamen Grundgesamtheit entstammen, d.h. sie sind nur rein zufällig verschieden, wurde mit Hilfe des parameterfreien Tests von Wilcoxon & Wilcoxon überprüft (16). Es handelt sich um einen Rangvarianzanalysentest für mehrere verbundene Stichproben. Die absoluten Differenzen der Rangzahlen sind in Tabelle 7 eingetragen. Die kritische Differenz für $k = 5$ Triglyceridbestimmungsmethoden und $n = 99$ Serumbestimmungen beträgt 61 bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% und 72 bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1%. Rangdifferenzen kleiner als diese Grenzwerte sind nicht signifikant unterschiedlich.

Es läßt sich zeigen, daß kein signifikanter Unterschied zwischen den Methoden Testomar, vollenzymatisch/INT, Behring, BM Peridochrom und BM UV-Test, vollenzymatisch auf dem 1%- oder 5% Niveau besteht. Dagegen unterscheiden sich die Methoden Rapid Test (Roche) und MD signifikant von den anderen drei. Andererseits läßt sich die Nullhypothese für Rapid Test (Roche) und MD untereinander nicht zurückweisen.

Linearität

Die Linearität, d.h. der Bereich, in dem ohne Verdünnung des eingesetzten Serums die Triglyceridkonzentration bestimmt werden kann, wurde durch Reihenverdünnung eines Patientenserums mit bekannter hoher Triglyceridkonzentration ermittelt. Die Tabelle 8 zeigt die von uns ermittelten Linearitätsgrenzen.

Tab. 8. Linearitätsgrenzen.

Methoden	Maximale Triglyceridkonzentration in mmol/l, ab der Vorverdünnung erforderlich ist	Laut Firmenvorschrift angegebene Verdünnungsgrenze in mmol/l, ab der Vorverdünnung erforderlich ist
BM UV-Test, vollenzymatisch	7,41	6,27
BM Peridochrom	7,98	7,98
MD	7,98	7,98
Rapid Test (Roche)	4,79	11,4
Testomar, vollenzymatisch/INT, Behring	7,41	7,98

Wiederfindung

Die Prüfung der Wiederfindung erfolgte mit Hilfe eines Kontrollserums bekannter niedriger Triglyceridkonzentration und eines Kontrollserums bekannter hoher Triglyceridkonzentration über Aufstokkungsversuche. Es wurden acht Seren innerhalb eines Konzentrationsbereichs von 600 bis 6000 mg/l erstellt und die experimentell ermittelte Triglyceridkonzentration mit der theoretisch zu erwartenden ins Verhältnis gesetzt. Geprüft wurde innerhalb des Linearitätsbereichs der einzelnen Methoden als Einzelbestimmung. Die mittlere Wiederfindung aus den acht Seren bekannter Konzentration für die einzelnen Triglyceridmethoden ist aus Tabelle 9 zu entnehmen.

Tab. 9. Ergebnisse der Wiederfindung, geprüft an acht Seren bekannter, aber unterschiedlicher Triglyceridkonzentrationen.

Methoden	Mittlere Wiederfindung
BM UV-Test, vollenzymatisch	-10,4%
BM Peridochrom	-11,4%
MD	+ 5,7%
Rapid Test (Roche)	+ 4,7%*)
Testomar, vollenzymatisch/INT, Behring	- 0,4%

*) nur an vier Seren bis max. 3,74 mmol/l geprüft.

Störungen durch endogene und exogene Substanzen

Es wurde die Frage geprüft, inwieweit endogene Substanzen wie Hämoglobin und Bilirubin und exogene Substanzen wie Medikamente mit den einzelnen Triglyceridmethoden interferieren und stören.

Störung durch Hämoglobin und Bilirubin

Einem triglyceridhaltigen Kontrollserum bekannter Konzentration wurde in steigender Konzentration von 0 bis 27,2 g/l Hämoglobin bzw. in steigender Konzentration von 0 bis 428 µmol/l Bilirubin zugesetzt.

Eine Interferenz wurde dann angenommen, wenn der Mittelwert aus einer Doppelbestimmung außerhalb $\pm 10\%$ des Hämoglobin- und Bilirubin-freien Meßwertes lag.

Wir stellten fest, daß Hämoglobin bis zur maximal geprüften Konzentration von 27,2 g/l die beiden kinetischen Bestimmungsmethoden nicht beeinflusst. Dagegen beobachteten wir eine Interferenz durch Hämoglobin bei den beiden Endpunktmethoden Testomar, vollenzymatisch/INT, Behring und MD ab einer Hämoglobinkonzentration von mehr als 2,7 g/l, bei BM Peridochrom dagegen erst ab 5,4 g/l.

Ein ähnliches Ergebnis wurde bei der Überprüfung der Störung durch zugesetztes Bilirubin ermittelt. Auch hier werden die beiden kinetischen Triglyceridbestimmungsmethoden durch Bilirubin bis zur geprüften Konzentration von 428 µmol/l nicht beeinflusst. Bei den Endpunktmethoden MD sowie bei BM Peridochrom erfolgte Störung ab einer Bilirubinkonzentration von 376 µmol/l, bei Testomar, vollenzymatisch/INT, Behring ab 284 µmol/l.

Störung durch Medikamente

Zur Prüfung der Störung durch Medikamente wurde einem triglyceridhaltigen aber medikamentenfreien Humanserumersatz (BISEKO) das zu prüfende Medikament in höchster im Serum vorkommender therapeutischer Konzentration zugesetzt. Dazu wurde in einem Vorversuch für jede Triglyceridmethode an zehn Tagen der Mittelwert und die Standardabweichung für den medikamentfreien Serumersatz ermittelt. Eine Störung wurde angenommen, wenn der Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung des mit dem zu prüfenden Medikament versehenen Serums außerhalb der dreifachen Standardabweichung des medikamentfreien Serums lag.

Es zeigte sich, daß lediglich Methyldopa in therapeutisch höchster Dosis die Triglyceridbestimmung bei BM Peridochrom beeinflusst. Andere Störungen fanden wir nicht (siehe dazu noch Tab. 10). Über Störungen durch in vivo entstehende Metaboliten kann durch diesen Versuch verständlicherweise keine Aussage gemacht werden.

Tab. 10. Pharmaka und Antikoagulantien, deren eventuelle Störung auf die in der Arbeit verwendeten Methoden geprüft wurden*).

	Konzentrationen der therapeutischen Maximaldosen in mg/l
Spironolactonum	20
Indometacinum	30
Doxepinum	150
Acidum acetosalicylicum	750
Probenecidum	260
Ampicillinum	900
Butylscopolaminum	300
Phenylbutazonum	280
Acidum ascorbicum	400
Bisacodylum	40
Cyclophosphamidum	240
Glibenclamidum	32
Nitrofurantoinum	98
Tetracyclinum	200
Chlorthalidonum	340
Digoxinum	0,1
Furosemidum	60
Chlordiazepoxidum	160
Phenobarbitalum	352
Dextran	6000
Phenprocoumonum	80
Chlorpromazinum	150
Penicillaminum	960
Methotrexatum	500
Norfefrin-HCl	2,4
Methansulfonsaures Natrium	900
Chloramphenicolum	600
Tolbutamidum	480
Gentamycinum	120
Chloroquinum	60
Methyldopum	400
Prednisolonum-succinat-natrium	8
Oxyphenbutazonum	600
Benzbromaronum	60
Acidum amidotrizoicum	1500
Allopurinolum	250
Natrium fluoratum	2000
Natrium oxalicum	2000
Titriplex III/EDTA	1000
Natrium citricum	5000

*) eventuelle Interferenzen durch Metabolisierungsprodukte wurden nicht berücksichtigt.

Danksagung

Wir danken Frau *Ingeborg Schmarsoch* für die sorgfältige technische Assistenz.

Weiterhin danken wir den Firmen Behringwerke AG., Boehringer Mannheim und Merz + Dade/AHS für die freundliche Überlassung von Reagenzien.

Literatur

1. Eggstein, M. & Kreutz, F. H. (1966) *Klin. Wochenschr.* 44, 262–267.
2. Carlson, L. A., Böttiger, L. E. & Anfeldt, P. E. (1979) *Acta Med. Scand.* 206, 251–360.
3. Logan, R. L., Thompson, M., Riemersa, R. A., Oliver, M. F., Olsson, A. G., Rössner, S., Callmer, E., Walldius, G., Kaijser, L., Carlson, L. A., Lockert, L. & Lutz, W. (1978) *Lancet* I, 949–955.
4. Gerbitz, K. (1972) *Medizin Heute* 15, 8–12.
5. Henze, K., Wallmüller-Strycker, A., Bauer, M., Wolfram, G. & Zöllner, N. (1981) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19, 1013–1019.
6. Mitteilungen des Statistischen Bundesamtes (1981) *Dtsch. Med. Wochenschr.* 106, 157–158.
7. Henkel, E. (1974) *Diagnostik* 7, 605–609.
8. Ziegenhorn, J. (1975) *Clin. Chem.* 21, 1627–1629.
9. Bartl, K., Neumann, U. & Ziegenhorn, J. (1979) *Lab. Med.* 3, 120–122.
10. Möllering, H., Wahlefeld, A. W. & Michal, G. (1974) in: *Methoden der enzymatischen Analyse* (Bergmeyer, H. U. ed.), 3. Aufl., S. 145–153. Verlag Chemie, Weinheim.
11. Haackel, R., von Borovitzény, K.-G., Keller, H., Knedel, M., Koss, H.-J., Liebegall, M.-A. & Sonntag, O. (1980) *Dt. Ges. f. Klin. Chemie e.V., Mitteilungen* 11, 195–231.
12. Bucolo, G. & David, H. (1973) *Clin. Chem.* 19, 476–482.
13. Wahlefeld, A. W. (1974), in: *Methoden der enzymatischen Analyse* (Bergmeyer, H. U. ed.), 3. Aufl., S. 1878–1882, Verlag Chemie, Weinheim.
14. Haackel, R. (1980) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 18, 433–437.
15. Haackel, R. (1981) *Med. Lab.* 34, 8–14.
16. Sachs, L. (1978) *Angewandte Statistik*, 5. Aufl., S. 426–429, Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin.

Dipl. Ing. med. Biochem. Aladár Bruckner
Dr. med. Matthias Moreth
Städtisches Krankenhaus – Zentrallabor
Gotenstraße 6–8
D-6230 Frankfurt a.M.-Höchst